

スライド凝集法および免疫ドットブロット法による肺炎球菌莢膜型別の試み

藤本, 秀士
九州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

小島, 夫美子
大阪大学大学院医学系研究科 医療技術科学 生体情報科学専攻 | 九州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

中上, 佳子
九州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

岩谷, 良則
大阪大学大学院医学系研究科 医療技術科学 生体情報科学専攻

他

<https://doi.org/10.15017/3202>

出版情報：九州大学医学部保健学科紀要. 3, pp. 39-45, 2004-02. 九州大学医学部保健学科
バージョン：
権利関係：

スライド凝集法および免疫ドットブロット法による肺炎球菌莢膜型別の試み

藤本 秀士¹⁾, 小島夫美子^{1,3)}, 中上 佳子¹⁾, 岩谷 良則³⁾, 竹森 紘一²⁾

Trial of Serotyping for *Streptococcus pneumoniae* Using Slide Agglutination or by Immuno Dot-Blot Technique.

Shuji Fujimoto, Fumiko Kojima, Yoshiko Nakagami, Yoshinori Iwatani, Koichi Takemori

Abstract

Streptococcus pneumoniae is the leading cause of community-acquired pneumonia, meningitis, and otitis media. In addition *S. pneumoniae* has been isolated from patients with conjunctivitis. In this study, we test the antisera kit (obtained from Denkaseiken, Japan) in order to serotype *S. pneumoniae* clinical isolates (two strains isolated from sputum and 31 ophthalmic isolates) by slide agglutination method or by immuno dot blot. While the two respiratory isolates were typable both by the methods, none of the ophthalmic isolates was typable. These findings suggest that uncapsulated strains might be common in ophthalmic *S. pneumoniae*.

Key word: *Streptococcus pneumoniae* 肺炎球菌, serotyping 血清型別, slide agglutination method スライド凝集法, dot-blot technique ドットブロット法

はじめに

肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae* は、通性嫌気性グラム陽性球菌で、レンサ球菌属 (genus *Streptococcus*) に属する。他のレンサ球菌に比べて連鎖が短い傾向にあり双球菌状を呈するものが多いため、肺炎双球菌 *Diplococcus pneumoniae* とも呼ばれる¹⁾。健康人では、小児で15%、成人で5%程度、口腔・咽頭に常在菌として保有する²⁾。抵抗力が低下した場合に、化膿性の炎症を起こし、肺炎、胸膜炎、膿胸や敗血症など、様々な感染症の原因菌となる³⁾。また、乳幼児では、中耳炎や髄膜炎の起炎菌として重要である⁴⁾。

肺炎球菌感染において、最も重要な病原因子が莢膜である。肺炎球菌の莢膜は、細胞壁の外側に存在する200～400 nmの多糖体性の厚い層である¹⁾。莢膜保有株は莢膜非保有株に比べ毒力が強いとされ、侵襲性疾患から分離される肺炎球菌菌株のうち、97.8%～99%が莢膜保有株であると報告もある⁵⁾⁶⁾。そして、莢膜多糖体に対する特異抗体が感染防御活性を持つことからワクチンに使用されている⁷⁾⁸⁾。

本菌は、この莢膜多糖体の抗原性により、現在80種類以上の血清型が確認されている⁹⁾。肺炎球菌の血清型別の目的は、ワクチンに用いる菌株決

1) 九州大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

2) (株)シー・アール・シー総合研究所

3) 大阪大学大学院医学系研究科 医療技術科学 生体情報科学専攻

定およびその感染防御効果予測のための流行菌株の調査やペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) など、薬剤耐性菌株の分布や菌型分布の年次推移・地域差など肺炎球菌感染症の疫学調査にも不可欠となっている⁸⁾¹⁰⁾。

従来、肺炎球菌の莢膜型別は、抗血清を用いた莢膜膨化反応で決定してきた¹⁾。莢膜膨化反応とは、特異抗血清を菌体に作用させると光学顕微鏡下で莢膜が膨化したように観察される現象をいう。予め染色液で菌体を染色しておき、これに抗血清を作用させると、莢膜に型特異抗体が結合することによって抗原・抗体複合体が形成され、菌体がぼやけて見える。一方、莢膜部で抗原・抗体反応が起こらなければ、染色された菌体ははっきりと観察される。生理食塩水と染色菌とを混ぜたものを対象とし、様々の抗血清にあわせてみて莢膜が著しく膨化した血清を突き止めることにより莢膜型を決定する¹¹⁾。しかし、この方法は、操作が煩雑で時間のかかる方法である。また、判定には熟練を要し、型別用血清も高価な外国製 (Statens Seruminsitute, Copenhargen, Denmark) が必要なため、特殊な機関で行われる事がほとんどであった。

2000年に、日本で、スライド凝集反応を用いた肺炎球菌型別法の抗血清が市販されるに至った (肺炎球菌莢膜型別用免疫血清「生研」・デンカ生研株式会社)。抗血清のセットは、混合血清8種類と単味血清34種類である (表1)。抗血清は、それぞれの特異凝集素を含む製剤で、各莢膜抗原の血清型参照株のホルマリン死菌をそれぞれ免

疫原として健康ウサギに高度に免疫して得た血清を、56℃、30分間加熱処理した後、類縁凝集素を吸収除去し、無菌ろ過して調整したものである。スライド凝集反応は、抗血清と対応する抗原を持つ菌株を混和させたとき、抗原抗体反応により、菌体の凝集塊が生じ、これを肉眼的に観察するもので、簡単に実施できる利点がある⁹⁾。

今回、喀痰より分離された肺炎球菌2株と眼脂より分離された菌株31株を対象に、この型別血清を利用したスライド凝集反応とドットプロット法による莢膜型別の決定を試みた。ドットプロット法は、免疫プロット法の1種で、ナイロン膜やニトロセルロース膜に抗原をスポットして固定し、特異抗体を作用させて反応の有無をみる方法で、感度に優れている。また、サンプル・抗血清ともに微量で済み、経済的である。この方法で、肺炎球菌の莢膜型別が可能なのか、スライド凝集反応との比較検討を行ったので、その結果を報告する。

対象と方法

被検菌株と培養方法

使用した肺炎球菌菌株は、喀痰から分離された臨床分離株2株および眼科病院受診患者の眼脂からの分離株31株である。これらの菌株は、分離後にマイクロバンクバイアル (アスカ純薬) に凍結 (-80℃) 保存しておいた。実験に際しては、凍結菌液を、1株毎にウマ血液寒天培地 (バイタルメディア極東) 上に、マイクロチップで数滴垂らし、35℃、5% CO₂ 下で18~24時間培養し、菌株を起こした。生えてきた菌を塗り広げ、さらに同一条件下にて18~24時間、培養を行った。肺炎球菌は溶菌しやすいため、培養当日の新鮮培養菌を使用した。

スライド凝集による莢膜型別法 (図1参照)

肺炎球菌莢膜型別血清「生研」 (デンカ生研) を用いて、添付文書に従って莢膜型別検査を行った。まず、混合血清 (8種類) で各々検査し、陽性と判定された場合、その混合血清を構成する単味血清を用いて試験した。具体的には、ガラス鉛筆で

表1 肺炎球菌莢膜型別血清「生研」 (デンカ生研)

混合血清	単味血清						
混合1	1型	2型	3型	4型	5型		
混合2	6型	8型	9型	10型			
混合3	11型	12型	14型	15型	16型		
混合4	17型	18型	21型	22型			
混合5	20型	29型	31型	33型	34型	35型	47型
混合6	23型	25型	28型	41型	46型		
混合7	27型	32型	36型	38型	39型		
混合8	7型	19型	24型	40型			

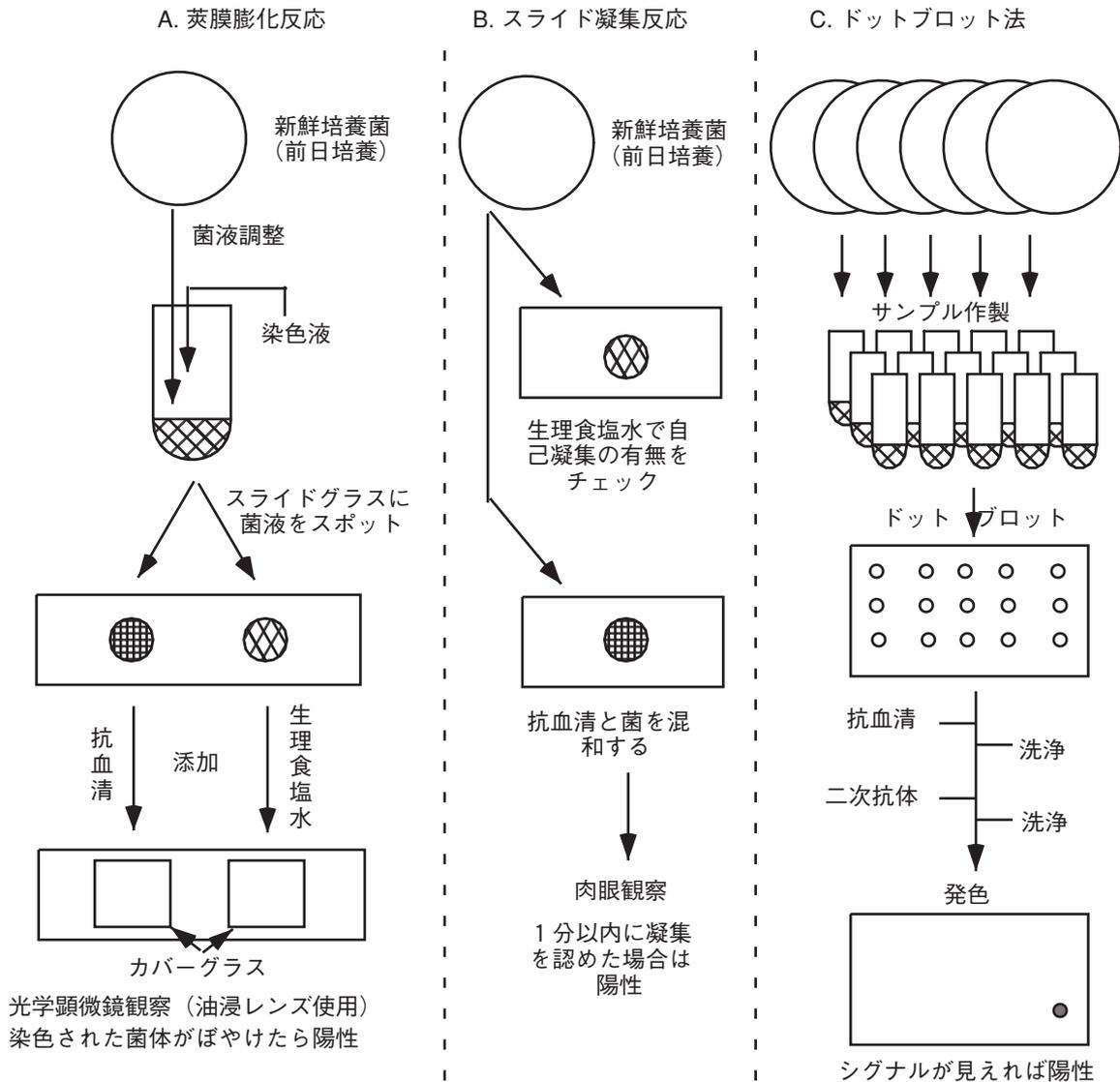


図1 検査の手順

スライドガラスを数区画に分け、区画毎に各混合血清と生理食塩水の1滴 (30 μ l) を滴下した。次に、血液寒天培地上の発育菌を滅菌竹串で掻き取り、血清及び生理食塩水の上方におき、各々をよく混和した。スライドガラスを1分間、前後に傾斜させながら肉眼で凝集の有無を判定した。最初に、菌体が生理食塩水との反応で凝集 (自然凝集) していないことを確認してから、各血清との反応では1分間以内に強い凝集が観察されたものだけを陽性とした。

ドットプロット法 (図1 参照)
サンプル作製

1.5ml のサンプルチューブに SDS-PAGE サンプルバッファー (1% SDS, 1% 2メルカプトエタノール, 10 mM Tris-HCl (pH6.8), 20%グリセリン) 200 μ l ずつ分注し、各菌株毎に、培養した菌を白金耳を用いてループに半分量釣菌して懸濁した。チューブのふたを閉めて、沸騰水中で10分間、加熱処理したものをドットプロットのサンプルとして使用した。サンプルは、実験に供するまで4℃で保存した。

膜への転写

縦5~6cm×横7~8cmに切断したPVDF膜 (0.2 μ m フルオロトランス, 日本ジェネティ

クス)を100%メタノールに30秒間浸したのち、リン酸緩衝液(PBS)に10分間浸して平衡化した。試料の添加には水流式バキュームプロッター(trans-Vac TE80, Hoefer社)を用いた。PVDF膜に陰圧をかけながら、各サンプルを3~5 μ lずつ順番に適切な間隔でプロットした。全ての試料をプロットし終わった後にPBS 10 mlを膜に満遍なくかけてサンプルバッファーの色素を洗い流した。

抗血清(一次抗体)処理

サンプルをプロットしたPVDF膜は、室温にて30分間、ウシ血清アルブミン溶液(2%ウシ血清アルブミンを含むPBS)に浸してブロッキングを行った。PBS-Tween(0.1% Tween-20を含むPBS)にて15分間、振盪洗浄を3回行った後に、一次抗体として抗血清(デンカ生研の肺炎球菌莢膜型別血清をPBS-Tweenで2000倍に希釈

したもの)を室温にて1時間作用させた。その後、PBS-Tweenにて15分間、振盪洗浄を3回行った。

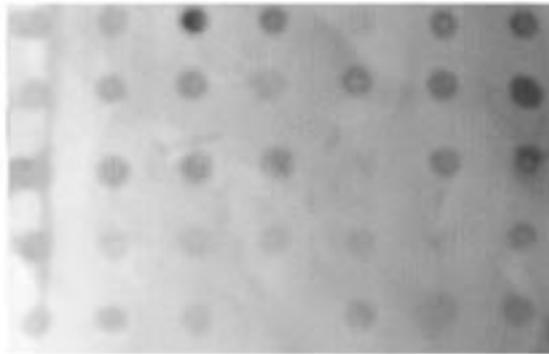
二次抗体処理とシグナルの検出

PBS-Tweenで2000倍希釈した二次抗体(ペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgGヤギ抗体)を室温にて1時間作用させた。その後、PBS-Tweenにて15分間、振盪洗浄を3回行った後、ペルオキシダーゼ発色液(4-chloro-1-naphtol 8 mg, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) 20 ml, 30% H₂O₂ 7 μ l)により発色させてシグナルを肉眼で観察した。

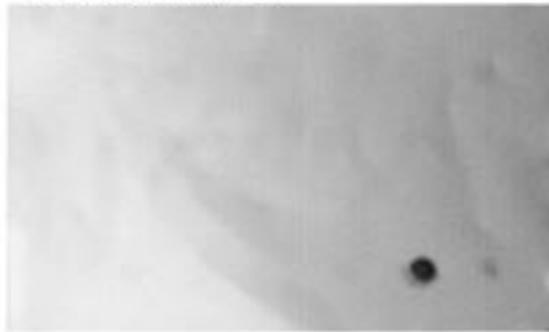
結 果

スライド凝集反応では、特徴的な大きな凝集塊が観察された。喀痰からの分離菌No.428(ムコイドタイプ)は、混合血清1とのみ凝集塊を形成し、その他の混合血清とは形成しなかった。混合血清1に対応する単味血清においては、3型抗血清と

A. 混合血清 1



B. 単味血清 23



プロットしたサンプルNo.

1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
23	24	26	27	28	30	31
32	33	34	428	1605	428	

図2. 免疫ドットプロット法

混合血清においては偽陽性反応がみられ明確な判定が難しいが、単味血清では陽性・陰性が明瞭に判定が容易である。

のみ凝集塊を形成し,他の単味血清とは形成せず,血清型は Type 3 型と決定した。同じく喀痰分離菌 No.1685(ノンムコイドタイプ)は,混合血清 6 とのみ凝集塊を形成し,その他の混合血清とは形成しなかった。混合血清 6 に対応する単味血清においては,23 型抗血清とのみ凝集塊を形成し,他の単味血清とは形成せず,血清型は Type 23 型と決定した。一方,眼脂より分離された肺炎球菌菌株 32 株は,いずれの混合血清とも肉眼的に識別しうる凝集塊は形成しなかった。実体顕微鏡下の観察でも凝集は観察できなかった。

ドットプロット法では,特異抗原に結合した抗血清をペルオキシダーゼを結合させた二次抗体のシグナルで検出する。混合血清 1 では, No.428 株をはじめ,眼脂分離菌の数株にシグナルが, No.1605 株を含む多くの株に弱いシグナルがみられた(図 2 A)。そこで,混合血清 1 に対応する単味血清 1 型~5 型を一次抗体としてドットプロットを行った。その結果, No.428 株のみが 3 型血清と反応したのみで,その他の菌株は試したいずれの単味血清とも反応しなかった。同様に,混合血清 6 では,複数株にシグナルが認められたが,対応する単味血清を試した結果, No.1605 株が 23 型血清と反応して明瞭なシグナルが認められたのみで(図 2 B),その他の単味血清はいずれの菌株とも反応しなかった。

考 察

これまで国際的に広く行われてきた肺炎球菌の莢膜膨化による型別法は,操作がかなり煩雑であり,なかなか我が国の一般病院で行われることが少ないのが現状である。使用する抗血清は,特異抗体 83 全てを含む多価血清,9 種のプール血清,型を区別する因子血清よりなり,デンマーク製で高価である⁹⁾。また,膨化反応の程度を顕微鏡下に判定するには熟練を要し,標準化が困難であった。ムコイド型集落に多い Type 3 型では,莢膜が膨化するまでに時間がかかる場合があり,陰性の場合にはしばらく湿潤箱に放置して再度観察するなどの処置が必要である¹¹⁾。

近年,我が国でスライド凝集反応のための莢

膜型別抗血清が発売された。デンマーク製の型別血清との成績比較では,順天堂大学附属病院臨床検査部の臨床分離株 448 株中 422 株は明瞭な凝集によって 22 種の血清型に型別され,デンマーク製の型別成績の結果と良く一致している⁹⁾。我々の結果でも,喀痰から分離された菌株では,混合血清,単味血清ともに一つのものとのみ凝集反応がみられた。凝集は肉眼で観察可能な大きさであり,判定は容易であった。type 3 型と判定された No.428 株は,莢膜膨化反応と異なり,凝集は 1 分以内に観察された。これらの結果から,スライド凝集による血清型別抗血清は有用性が高く,外国製のものに比べて安価で入手しやすく,国内で普及していくと思われる。

一方,今回調べた眼脂からの分離菌 31 株では,抗血清によってスライド凝集が確認された株は無かった。眼科領域においても急性や慢性の結膜炎あるいは角膜炎のような眼科感染症の検査材料から,肺炎球菌が原因菌として検出される¹²⁾¹³⁾。日本においても眼科領域における検出菌の 5%前後を肺炎球菌が占めており,決して無視できない¹⁴⁾。多くは散発例であるが,学校や地域での流行の報告も散見される^{5) 6)15)16)}。しかしながら,これらの眼科感染に由来する本菌の莢膜型別については型別不能菌株が多く,よく知られていない。Broome らによれば,結膜炎由来の肺炎球菌菌株では,その 24%が莢膜型別不能であり,他の部位からの分離株の 0~6%に比べて優位に高い¹⁶⁾。前述の順天堂大学附属病院臨床検査部の臨床分離株 448 株中型別不能株はわずか 10 株(2.2%)であった。他の報告でも眼脂由来の本菌の型別不能の割合は高い¹⁵⁾¹⁷⁾。侵襲性疾患と非侵襲性疾患との違いがあるのかも知れない。

今回,スライド凝集反応と同じ抗血清を使用してドットプロット法による型別判定を試み,スライド凝集反応と比較検討した。ドットプロット法は,免疫プロット法の 1 種で,ナイロン膜やニトロセルロース膜に抗原を固定し,特異抗体を作用させて反応の有無をみる方法で,感度に優れている。スライド凝集で観察できない微細な反応の検出を期待した。その結果,混合血清においては,

疑陽性と思われる反応がみられ、明確な判定が難しかった。一方、単味血清においては、陽性・陰性が明瞭であり、その結果はスライド凝集法の結果と一致した。単味血清によるドットプロット法は、スライド凝集法に比べやや煩雑なものの、利点もある。まず、サンプル・抗血清ともに微量で済み、経済的である。肺炎球菌は時間がたつと自己融解するため、スライド凝集では培養した菌を即座に検査する必要がある。ドットプロット法では、サンプルバッファーで処理しておけば保存が可能である。膜にプロットした状態にすれば、室温での長期間保存や郵送が可能であり、検査の一助となりうると思われる。

おわりに

肺炎球菌は、肺炎や髄膜炎などの起炎菌として临床上重要な細菌である。その莢膜型別は疫学調査に欠かせないにもかかわらず、莢膜膨化による判定法が煩雑でコストがかかるために一般病院では日常検査の範囲を超えていた。スライド凝集法は、抗血清をやや多く使用するものの、簡便であり、普及すると思われる。今回検討したドットプロット法も用途を選べば有用と考える。今後ますます肺炎球菌の血清型別データが蓄積されて、我が国における肺炎球菌感染症の制御につながることを期待したい。

文 献

- 1) 中山浩次：レンサ球菌。吉田眞一，柳 雄介（編）：戸田新細菌学 改訂 32 版，南山堂，東京，2002，pp480-492
- 2) Baron EJ, Finegold SM: 25.1. Epidemiology and pathogenic mechanism. In: *Streptococcus pneumoniae*. in Manning S, Gunter A (eds): Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed, CV Mosby, 1990, pp.334-335
- 3) Marston BJ, Plouffe JF, File TM Jr et al: Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance Study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. Arch Int Med 157:1709-1718, 1997.
- 4) Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, et al: Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. New Engl J Med 337:970-976, 1997.
- 5) Martin M, Turco JH, Zegans ME, et al: An outbreak of conjunctivitis due to atypical *Streptococcus pneumoniae*. New Engl J Med 348:1112-21, 2003.
- 6) Leibowitz HM: The red eye. New Engl J Med. 343:345-51, 2000.
- 7) CDC : Recommendation of the immunization on Practices Advisory Committee: Pneumococcal polysaccharide vaccine. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 38:64-76, 1989.
- 8) 福見秀雄，木村三生夫，加藤俊一：肺炎球菌多糖体 23 価ワクチン（ニューモバックス）の安全性と抗原性に関する臨床報告。感染症学雑誌 58：495-511，1984.
- 9) 小栗豊子，三澤成毅，中村文子，他：スライド凝集反応による肺炎球菌の血清型別。感染症学雑誌 76：479，2002.
- 10) 柳瀬杉夫，降井佐太郎：日本におけるニューモコッカス菌莢膜血清型の分布。Kobe J Med Sci 32:105-113, 1986.
- 11) 小栗豊子：主要病原菌の疫学マーカー 血清型別 肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae*. 臨床と微生物 23: 685-691, 1996.
- 12) O'Brien TP: Conjunctivitis. In: Mandell GL, Benette JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's principle and practice of infectious diseases. 5th ed. vol. 1 Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000 pp1252-1256.
- 13) Seal DV, Barrett SP, McGill JI: Aetiology and treatment of acute bacterial infection of the external eye. British Journal of Ophthalmology. 66:357-60, 1982.
- 14) 宮尾益也：眼感染症と耐性菌 眼科 43:923-931, 2001.
- 15) Ertugrul N, Rodriguez-Barradas MC, Musher DM, et al: BOX-polymerase chain reaction-based

- DNA analysis of nonserotypeable *Streptococcus pneumoniae* implicated in outbreaks of conjunctivitis. J Infect Dis. 176:1401-5, 1997
- 16) Shayegani M, Parsons LM, Gibbons WE Jr, Campbell D: Characterization of nontypable *Streptococcus pneumoniae*-like organisms isolated from outbreaks of conjunctivitis. J Clin Microbiol 16: 8-14, 1982.
- 17) Broome CV, Facklam RR: Epidemiology of clinically significant isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Rev Infect Dis. 3 :277-81, 1981.

